



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **02115193 A**(43) Date of publication of application: **27.04.90**

(51) Int. Cl.

C07H 3/10
C12P 19/12(21) Application number: **63268767**(22) Date of filing: **25.10.88**(71) Applicant: **MITSUBISHI KASEI CORP**(72) Inventor: **MAEDA TOSHIHIRO**
NAKAZAWA ISAO**(54) PURIFICATION OF DIFRUCTOSE-DIANHYDRIDE****(57) Abstract:**

PURPOSE: To stably provide the subject compound purified in a high purity without causing a steep drop in the separation performance of a separating material because of enabling to be eluted with water by employing an alkali metal type strong cation exchange resin as the separating material.

CONSTITUTION: After an aqueous solution containing difructose.dianhydride is passed through a separating tower employing an alkali metal type (preferably Na

type) strong cation exchange resin as a separating material, the aqueous solution is eluted with water as an eluting agent to separate a difructose.dianhydride fraction from the eluted solution. In the time it is preferable that the raw material aqueous solution concentrated to give a dissolved material concentration of 30-70wt.% is used in an amount of 3-20vol.% based on the separating material and the separating material and the water which is used as the eluting agent are kept at a temperature of 60-80°C.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

①

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-115193

⑬ Int. Cl.⁵

C 07 H 3/10
C 12 P 19/12

識別記号

庁内整理番号

7417-4C
8214-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)4月27日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 ジフルクトース・ジアンヒドリドの精製方法

⑯ 特 願 昭63-268767

⑰ 出 願 昭63(1988)10月25日

⑱ 発 明 者 前 田 敏 弘 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

⑲ 発 明 者 中 沢 功 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

⑳ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉑ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

1 発 明 の 名 称
ジフルクトース・ジアンヒドリドの精製方法

2 特 許 請 求 の 範 囲

(1) ジフルクトース・ジアンヒドリドを含む水溶液を、アルカリ金属型の強酸性カチオン交換樹脂塔に通液し、次いで水を溶離剤としてジフルクトース・ジアンヒドリド画分を分取することを特徴とするジフルクトース・ジアンヒドリドの精製方法。

3 発 明 の 詳 細 な 説 明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、ジフルクトース・ジアンヒドリドの精製方法に関する。

〔従来の技術〕

ジフルクトース・ジアンヒドリド(「DFA」と略す)は動物体内では代謝されない非醗酵性の糖であるため、ノンカロリー甘味剤として注目をあびている。

DFAには4種類の異性体が存在し、そのう

ち、ジフルクトース1,2':2,6'ジアンヒドリド(「DFA I」と略す)、ジフルクトース1,2':2,3'ジアンヒドリド(「DFA II」と略す)及びジフルクトース2,6':6,2'ジアンヒドリド(「DFA IV」と略す)の3種のDFAが、イヌリン又はレグワン等の多糖類を原料として微生物の産生する酵素の作用により製造されることが知られている。

例えば、DFA Iはイヌリンを原料としアースロバクター・グロビフォルミスに属する細菌^②産生する酵素の作用により、又DFA IIは同様にイヌリンを原料としてアースロバクター・ウレアフアシエンズに属する細菌等の産生する酵素により製造されることが知られている。一方DFA IVはレグワンを原料としアースロバクター・ウレアフアシエンズに属する細菌等の産生する酵素により、製造されることが知られている。

これらの菌の産生する酵素を含有する液をイヌリン又はレグワンを含む水溶液に直接加える

特開平2-115193 (2)

か、もしくはかかる酵素を多孔質の陰イオン交換樹脂等に吸着固定化させたのち、塔に充填し、イヌリン等を含有する原料液を通液することによりDFA含有液を得ることが出来る。

しかしかかる方法で得られたDFA溶液はオリゴ糖を含むため純度は、約80%~85%と低い。

従来はクロマト分離剤として、活性炭単独又は活性炭とセライトの混合物を用い、エタノール水溶液を溶離剤とする逆相クロマト法によりオリゴ糖の分離が行われている。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしかかるクロマト法では有機溶媒であるエタノールを使用しなければならないこと、DFA含有液中の蛋白質高分子物質等の疏水性の大きな化合物の脱離が困難なため分離剤を繰り返し使用すると、分離性能が急激に低下するという問題があった。

本発明は、水で溶離が可能であり、分離剤の分離性能の急激な低下をひきおこすことなく、

菌の産する酵素(特開昭49-117688)、アースロバクター・グロビフォルミスに属する細菌の産する酵素(特開昭62-275694)を作用させる事により製造される。

DFA IVはレグァンを原料とし、アースロバクター・ウレアファシエンシスに属する細菌(Journal of Biochemistry 90, 1545~1548 (1981))、シュードモナス フルオレッセンシスに属する細菌(63年度日本農芸化学大会講演番号20a13)の産する酵素により製造することが出来る。

これらの酵素を原料に作用させる方法としては、菌体培養液から菌体を分離し得られる上澄液を直接5~40重量%の原料溶液中に原料溶液に対して1~10重量%添加し個々の酵素にとって適する条件下で、例えば、10~70℃、pH 4~11、要すればリン酸塩、酢酸塩等のpH緩衝剤、各種の酵素安定剤の添加のもと攪拌を行う方法、もしくは、これらの酵素をグルタルアルデヒド等により架橋固定化及びゼラチ

安定的に高純度のDFAを分離精製する方法を提供することを目的とするものである。

〔課題を解決するための手段〕

即ち、本発明は、ジフルクトース・ジアンヒドリドを含む水溶液を、アルカリ金属型の強酸性カチオン交換樹脂塔に通液し、次いで水を溶離剤として、ジフルクトース・ジアンヒドリド画分を分取することを特徴とするジフルクトース・ジアンヒドリドの精製方法を要旨とする。

DFAは下記の微生物の産生する酵素をイヌリン又はレグァンを含む水溶液に作用させることにより製造される。

DFA Iはイヌリンを原料としアースロバクター・グロビフォルミスに属する細菌の産する酵素(特開昭62-275693)又はアスペルギルス・フミガタスの産生する酵素(Canbohydrate Research, 73 (1979) 340-344)を作用させることにより製造することが出来る。

DFA IIは同様にイヌリンを原料とし、アースロバクター・ウレアファシエンシスに属する細

菌やカラギーナン等のゲル状物質又は多孔質の陰イオン交換樹脂に固定化させ塔に充填し原料水溶液をこれに通す方法を挙げることができる。

このようにして得られたDFA溶液はオリゴ糖を含むため純度は約80~85%程度である。

本発明に使用するアルカリ金属型強酸性カチオン交換樹脂としては、ジビニルベンゼン架橋ポリスチレンスルホン酸型の強酸性カチオン交換樹脂のアルカリ金属型、特にNa型のものを挙げることができる。

かかる、アルカリ金属型の強酸性カチオン交換樹脂を分離剤として充填した分離塔に溶存物質濃度が30~70重量%になるまで濃縮した溶液を分離剤体積に対して3~20容量%量供給し、次いで水で溶離流出させ、その流出液からDFAを主成分とする画分を分取する。その際、分離塔温度及び溶離水の温度は50~90℃、好ましくは60~80℃に保持する。

分離塔に供給する濃縮液の濃度が上記範囲より高すぎると、液粘度が上昇して分離性能が低

特開平2-115193 (3)

下する。また、その液濃度が低くすぎると、分離塔に供給すべき液体積が増大し、それにともない溶離液としての水の使用量が増大する。

分離塔に供給する濃縮液量が上記範囲より少ないと分離性能は向上するが分離剤当りの分離の生産性が低下してくるし、その濃縮液量が多すぎると分離性能が低下してくるので、分離塔へ供給する1回当りの濃縮液量は分離剤体積に対して上述のように3~20容量倍とするのが望ましい。

分離塔温度及び溶離水温度が上記範囲より低すぎると分離塔内で微生物が増殖し通液の圧力損失が増大し、かつチャネリングの原因となり分離能力が低下する。またその温度が高すぎるとDFA含有液中のオリゴ糖の熱分解を起し液の着色が著しくなる。

DFA水溶液中に懸濁物質が存在する場合は分離塔の閉塞をさけるためプレコート伊過遠心分離等の方法で懸濁物質を除去しておく必要がある。

せて繰返し使用する方法と、カルボン酸型の弱酸性カチオン交換樹脂のNa型のものを用い、このカチオン交換樹脂を充填した塔に含有液を通して含有液中の硬度成分を同様にイオン交換させて除き、Ca又はMg型に変わった同樹脂をHCl又はH₂SO₄等の強酸で再生してH型にしたのち、NaOH水溶液を流してNa型に戻してから繰返し再使用する方法等がある。含有液中の全塩濃度が低い場合はスルホン酸型の強酸性カチオン交換樹脂のNa型を用いるのが好ましく、全塩濃度が高い場合はカルボン酸型の弱酸性カチオン交換樹脂のNa型のものを用いるのが望ましい。

このようにして硬度成分を除去したDFA含有濃縮液を分離塔に供給し、溶離水で分離操作を繰り返すと分離塔内でDFA含有液中のオリゴ糖の熱分解により生成する酸によりアルカリ金属型の強酸性カチオン樹脂の一部がH型になり固体酸触媒として作用し、DFAを加水分解し、果糖とする。かかる不都合を防ぐため分離

なおイヌリン又はレグァンを含む水溶液に酵素を作用させることにより得られるDFA含有液中には、原料中の灰分由来の硬度成分や酵素反応時に培養液とともに添加される硬度成分、pH緩衝剤、酵素安定剤等として添加される薬剤中に硬度成分が通常含まれており、これらの硬度成分を含むDFA含有液の濃縮液をそのまま分離塔に通液するとイオン交換がおこり、分離剤がアルカリ金属型からアルカリ土類型になりオリゴ糖とDFAの分離が出来なくなるので、DFA含有液中に硬度成分が存在する場合は軟化処理し硬度成分を除去するのが望ましい。

DFA含有液中の硬度成分の除去法(軟化処理法)としては、通常、ジビニルベンゼン架橋ポリスチレンスルホン酸型の強酸性カチオン交換樹脂のNa型のものを用い、このカチオン交換樹脂を充填した塔にDFA含有液を通して、含有液中のCaイオンやMgイオンをNaイオンと交換させて除き、Ca型又はMg型に変わったカチオン交換樹脂をNaCl水溶液でNa型に再生さ

塔内液のアルカリ金属イオン濃度に対する水素イオン濃度のモル比率を0.05以下望ましくは0.01以下とし、分離塔内液と平衡状態にあるH型強酸性カチオン樹脂の割合を低くおさえる必要がある。

分離塔内液のアルカリ金属イオン濃度に対する水素イオン濃度のモル比率を低くおさえる手段としては、直性DFA含有濃縮液に苛性アルカリを添加しpHを上げて供給することも可能であるが共存する不純物によっては著しく着色をおこすこともあるので、必ずしも良い方法とは言えない。このような場合には多塩基酸のナトリウム塩、例えばリン酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩等のナトリウム塩の添加が望ましい。添加方法としては濃縮液又は溶離水に直接混合してもよく、またこれらの多塩基酸のNa塩水溶液を直接分離塔に供給しても良い。

このようにしてDFA濃縮液を分離塔に供給し分離を行うが、上記分離操作の一例として回分分離法についてくわしく説明する。まずDF

特開平2-115193 (4)

A含有濃縮液の一定量を分離塔に供給し次いで溶離水を供給すると第1図に示すごとく、DFA含有液中のDFAより分子量の大きなオリゴ糖その他の不純物が流出し、次いでDFAが流出してくるのでDFA流出画分を分取することにより、高純度のDFAを得ることが可能となり、この画分をイオン交換樹脂や活性炭で脱塩や脱色することにより容易に水溶液からDFAを晶析させることが可能となる。分離方法としてはDFA含有液中のオリゴ糖その他を含む画分とDFAを主成分として含む画分に分離すれば良い。

たとえば回分分離法(特開昭45-24807号公報、特開昭53-149870号公報、特開昭55-61903号公報等)や擬似移動床方式による連続分離法(米国特許第2985589号明細書)等のような分離操作法を採用することができる。
[実施例]

次に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが本発明は下記実施例に限定されるもので

3.2cm)に通液し、培養液中のイヌリン-D-フラクトトランスフェラーゼを吸着固定化させ、さらに1Lの純水で十分に洗浄することにより酵素固定化カラムを得た。

次いでこの酵素固定化カラムに、脱塩水で調整した100g/L濃度のイヌリン水溶液(pH 6.0)を30℃で300ml/hrの速度で通液することにより、DFA II濃度80.5g/L、オリゴ糖その他19.5g/LのDFA含有液を得た。この液を42.4重量%まで濃縮し、析出する白色沈殿物質を、ケイソウ土(ハイフロー・スーパーセル)によりプレコートした伊過により除去し、清澄液を得た。~~得られた清澄液を得~~
~~得られた清澄液に~~Na₂HPO₄を10ppmとなるように添加することにより、pHを7.5としたのち、その7.5mlを42.2ml/hの速度で、Na型の強酸性カチオン交換樹脂ダイヤイオンUBK530(三菱化成株式会社製)150mlを充填したカラム(内径1.6cm、充填層高7.5cm)に60℃で供給し、ひきつづき水(溶離水)を

はしない。

実施例1

アースロバクタ・イリミスMCI2297号菌(FERM P-9893)を、5Lのジャーに仕込んだ下記組成の培地3Lに接種し、通気量0.5V/V/M(空気の体積/培地の体積/分)、攪拌速度500rpmの好気性条件下で、30℃の温度で24時間培養した。

| | | |
|--------------|-------|---|
| 培地：イヌリン | 50 | g |
| 硝酸ナトリウム | 2 | g |
| 硫酸マグネシウム・7水塩 | 0.5 | g |
| 塩化カリウム | 0.5 | g |
| リン酸二水素カリウム | 0.5 | g |
| 塩化鉄(II) | 0.001 | g |
| 酵母エキス | 0.2 | g |
| 水 | 1 | L |

培養後、遠心分離により除菌し、この上澄液3Lをダイヤイオン[®]HPA75(三菱化成株式会社製リン酸型多孔質陰イオン交換樹脂)100mlが充填されたカラム(内径2cm、充填層高

同一速度同一温度で供給した。分離塔塔底からの流出液のフラクションをさらにクロマトグラフィー(充填剤：MCI Gel CK08S、検出器：屈折計)により分析し、第1図に示す結果を得た。第1図の横軸は分離塔充填樹脂体積に対する流出液の体積比(床容量)を示し、縦軸は流出成分の濃度を示す。オリゴ糖その他の不純物は床容量0.35から流出し始め、床容量0.56で流出し終るので床容量0.56で前半と後半の2つの画分に分けることにより後半画分としてDFA IIを主成分とする画分をうる事が出来た。

実施例2

実施例1と同一組成の培地3Lの入った5Lジャーを用いアースロバクタークレファシエンス(FERM P-19695)を、通気量0.5V/V/M、攪拌速度500rpmの条件下、30℃で24時間培養した。培養後遠心分離により除菌し、この上澄液3Lをリン酸型多孔質陰イオン交換樹脂、ダイヤイオン[®]HPA75(三菱

特開平2-115193 (5)

化成株式会社製造) 100 mlを充填したカラム (内径2 cm 充填層高3.2 cm)に通液し、培養液中のインスリン-D・フラクトトランスフェラーゼを吸着固定化させ、さらに1 Lの純水で充分に洗浄することにより酵素固定化カラムを得た。

次いで、水道水で100 g/L濃度に調整したインスリン水溶液を、塩酸でpH 6.0に調整後、30℃で60 ml/hrの速度で上記固定化酵素カラムに通液し、DFA II濃度78.2 g/L (オリゴ糖その他21.8 g/L)のDFA含有液を得た。次いでNa型陽イオン交換樹脂ダイヤイオン[®]SKIB (三菱化成株式会社製造)に通液速度(SV)3 l/hで通液することによりDFA含有液中の硬度成分を除去し、この液を42.0重量%まで濃縮し、析出する白色沈殿物質をケイソー土(ハイフロー・スーパーセル)によるプレコート処理により除去し澄清液を得た。この澄清液にNa₂HPO₄を20 ppmとなるよう添加することによりpH 7.5としたのち、7.5 mlを42.2 ml/hの速度でNa型強酸性カ

チオン交換樹脂ダイヤイオンUBK530 (三菱化成株式会社製造) 150 mlを充填したカラム (内径1.6 cm 充填層高7.5 cm)に60℃で供給し、ひきつづき溶離水を同一速度同一温度で供給した。分離塔塔底からの流出液組成は実施例1と同様の結果であったので、床容量0.56から0.65までの液を分取し、98%以上の純度のDFA II含有量を取得することが出来た。

〔発明の効果〕

本発明方法によれば、水で溶離が可能であり、分離剤の分離性能の急激な低下をひきおこすことなく、安定的に高純度のDFAを分離精製することができる。

* 図面の簡単な説明

第1図は実施例1における分離塔塔底からの流出液の床容量に対する流出成分の濃度を作図した図である。

出願人 三菱化成株式会社

代理人 弁理士 長谷川 一

(ほか1名)

第1図

